

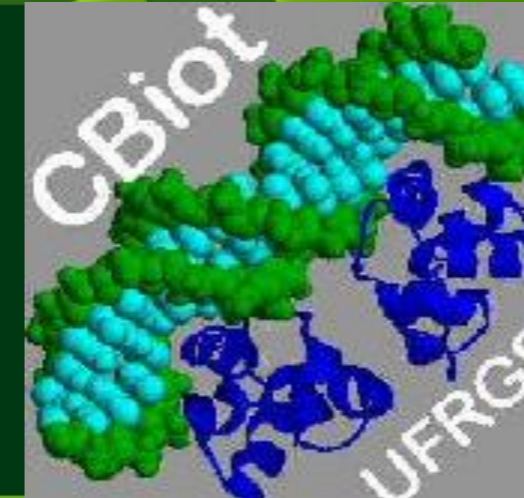
COMPARATIVO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO SOYURETOX E JABURETOX: PEPTÍDEOS RECOMBINANTES DERIVADOS DE DUAS ISOFORMAS DE UREASE

Andressa Urbano Machado¹, Célia Regina Carlini^{2,3}

¹ Acadêmica de Farmácia, UFRGS

² Pesquisadora do Instituto do Cérebro, PUCRS

³ Pesquisadora do Centro de Biotecnologia, UFRGS



www.ufrgs.br/laprottox

Introdução

Ureasas são metaloenzimas, produzidas por plantas, fungos e bactérias, que catalisam a hidrólise da ureia à amônia e dióxido de carbono. Diversas atividades biológicas, que independem da atividade ureolítica, foram demonstradas por nosso grupo para ureases vegetais, sugerindo que esta enzima possa estar envolvida em mecanismos de defesa de plantas contra insetos e fungos. A leguminosa *Canavalia ensiformis* possui três isoformas de urease: a JBU, a Canatoxina e a JBURE-II. A Canatoxina, ao sofrer hidrólise por enzimas do tipo catepsinas, libera um peptídeo entomotóxico denominado Pepcanatox. O Jaburetox é um peptídeo recombinante e equivalente ao Pepcanatox, utilizando como molde para a clonagem a sequência da JBURE-II. Estudos prévios demonstraram que o Jaburetox apresenta atividade fungitóxica contra fungos filamentosos fitopatogênicos, como *Penicillium herquei*, e contra leveduras, como *Candida parapsilosis*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *Pichia membranifasciens*. Soyuretox é um peptídeo recombinante derivado da urease ubíqua de soja (*Glycine max*), apresentando 72 % de identidade com o Jaburetox. Dados experimentais prévios mostram que Soyuretox apresenta toxicidade contra as leveduras *Candida tropicalis* e *Saccharomyces cerevisiae*. Desta forma, considerando o potencial desses peptídeos para o desenvolvimento de cultivares de plantas resistentes a fungos fitopatogênicos e ao seu potencial uso como protótipo para futuros fármacos antifúngicos, o objetivo do trabalho é estudar a atividade antifúngica do Soyuretox contra fungos filamentosos e compará-la com a do Jaburetox.

Materiais e Métodos

1) Atividade Antifúngica: Ensaio Quantitativo

A atividade dos peptídeos foi testada contra os fungos filamentosos *Penicillium herquei*, *Curvularia lunata*, *Fusarium sp.* e *Diaphorthe sp.*, sendo os dois últimos patógenos de soja. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

1.1. Ensaio de Turbidimetria

O ensaio consistiu na incubação, em placa de 96 poços, de uma suspensão de esporos (10^6 esporos/mL) em meio caldo batata dextrose juntamente com os peptídeos jaburetox e soyuretox, ambos nas concentrações de 20 e de 40 μ M. Como controle positivo, foi utilizado o antifúngico Fluconazol nas concentrações de 2 e de 4 μ g/mL, sendo o controle negativo tampão Tris 10 mM, pH 7,0 (Figura 1). O crescimento fúngico foi monitorado a cada 24 horas (até 96 horas) por turbidimetria a 620 nm e 28 °C, utilizando uma leitora de placas acondicionada em fluxo laminar.

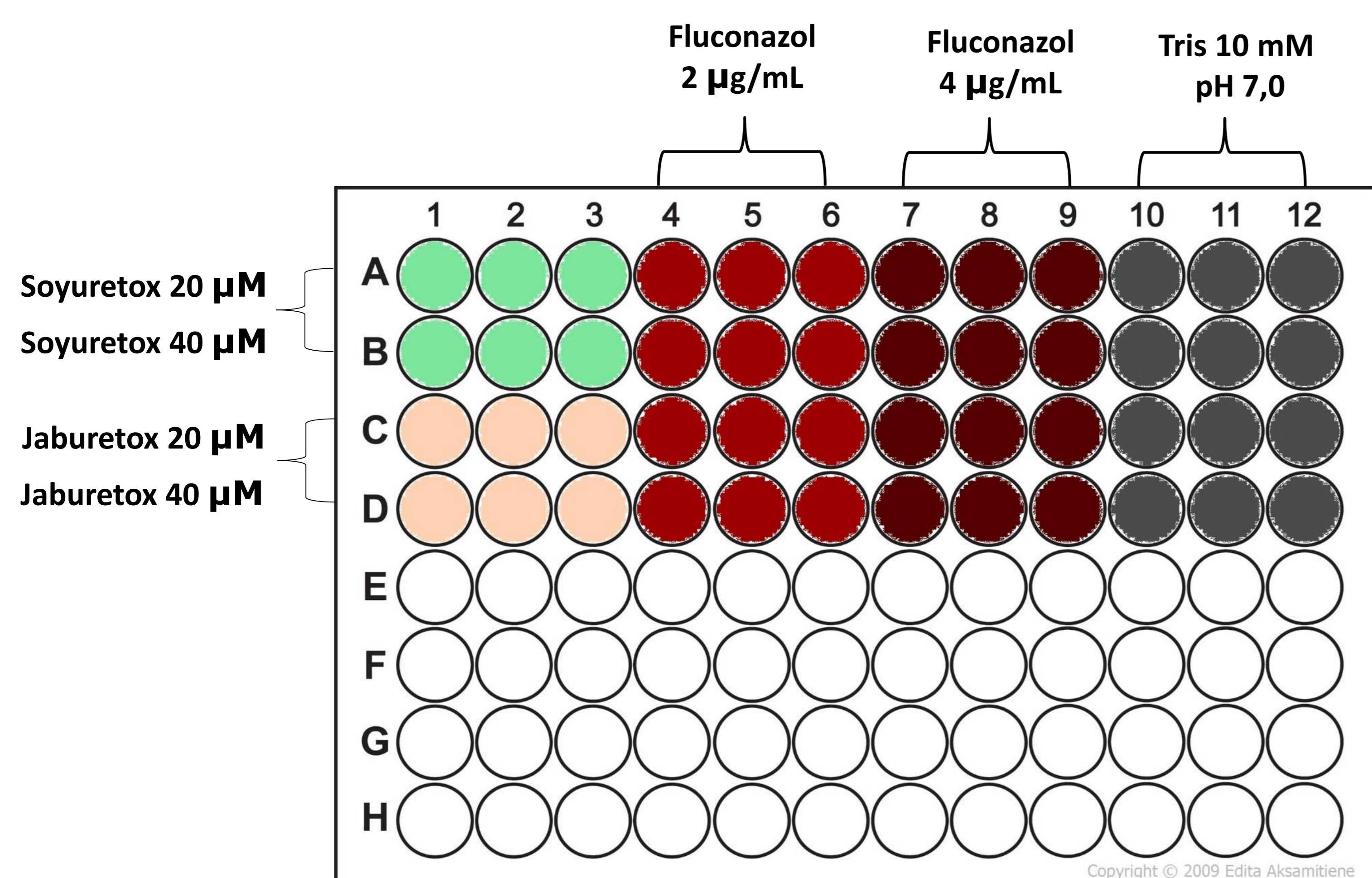


Figura 1. Esquema representativo do ensaio antifúngico e a forma com que os peptídeos (Soyuretox e Jaburetox) e os controles foram distribuídos nas placa de 96 poços.

1.2. Determinação da Massa Seca

Ao término da última leitura por turbidimetria, o micélio fúngico presente na microplaca foi coletado e acondicionado em tubos pré-pesados, os quais permaneceram em estufa a 70 °C até a completa secagem do material. Assim, pôde-se determinar a massa seca de cada condição testada e relacioná-la com as respectivas medidas de absorbância obtidas anteriormente.



Figura 2. Esquema representativo do ensaio de determinação da massa seca.

2) Atividade Antifúngica: Ensaio Qualitativo

2.1. Viabilidade fúngica

Realizou-se um teste qualitativo de modo a avaliar a viabilidade de cada um dos fungos após o tratamento com diferentes concentrações de Soyuretox e Jaburetox. Para isso, alíquotas foram coletadas dos poços e o micélio foi semeado em placas de Petri contendo ágar batata dextrose, as quais foram mantidas em estufa a 28 °C por um período de até 5 dias.

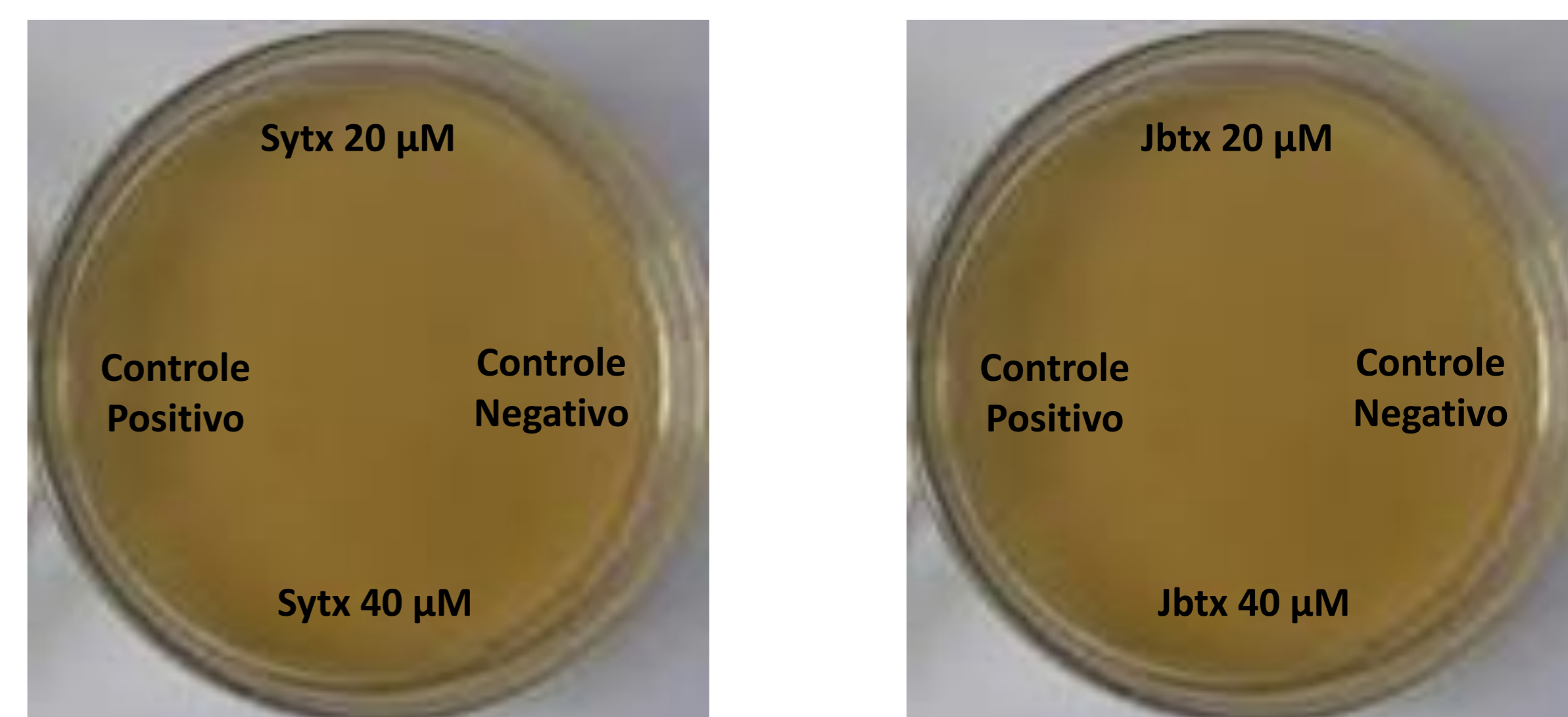


Figura 3. Esquema representativo do ensaio de viabilidade fúngica e a forma com que os peptídeos (Soyuretox e Jaburetox) e os controles foram distribuídos nas placas de Petri contendo ágar batata.

Resultados

Os experimentos ainda estão em andamento. Abaixo, estão os resultados preliminares determinados para o fungo *Penicillium herquei*. Nas tabelas 1 e 2 estão os resultados referentes ao ensaio de turbidimetria e de massa seca, respectivamente. No ensaio de turbidimetria, não é possível verificar uma diferença nas absorbâncias, quando comparado aos controles. Entretanto, na determinação de massa seca é possível observar a inibição do crescimento fúngico na presença do peptídeo Soyuretox, nas concentrações de 20 e de 40 μ M.

Tabela 1: Ensaio preliminar com *Penicillium herquei*: variação da absorbância a 620 nm ao longo do ensaio antifúngico para cada uma das condições testadas.

Tempo de Ensaio	Absorbância Sytx 20 μ M	Absorbância Sytx 40 μ M	Absorbância Jbtx 20 μ M	Absorbância Fluconazol 2 μ g/mL	Absorbância Fluconazol 4 μ g/mL	Absorbância Tampão Tris 10 mM
0 h	0,062	0,062	0,067	0,060	0,060	0,062
24 h	0,150	0,164	0,243	0,108	0,137	0,106
48 h	0,229	0,297	0,273	0,171	0,286	0,148
72 h	0,354	0,377	0,561	0,370	0,469	0,346
96 h	0,641	0,638	1,4	0,647	0,603	0,735

Tabela 2: Ensaio preliminar com *Penicillium herquei*: valores de massa seca (mg) após 96 h de ensaio para cada uma das condições testadas.

	Sytx 20 μ M	Sytx 40 μ M	Jbtx 20 μ M	Fluconazol 2 μ g/mL	Fluconazol 4 μ g/mL	Tampão Tris 10 mM
Massa seca após 96 h de ensaio (mg)	1,85	2,4	2,45	2,67	2,65	3,37